



ESCOLA UNIVERSITÁRIA VASCO DA GAMA

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

**Listeriose em Pequenos Ruminantes:
Apresentação de um Caso Clínico**

Ana Patrícia Queirós Simões Santos

Coimbra, julho de 2018



ESCOLA UNIVERSITÁRIA VASCO DA GAMA

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

Listeriose em Pequenos Ruminantes: Apresentação de um Caso Clínico

Coimbra, julho de 2018

Ana Patrícia Queirós Simões Santos

Aluna do Mestrado integrado em Medicina Veterinária

Constituição do Júri

Presidente do Júri: Professora Doutora

Eduarda Silveira

Arguente: Professor Doutor George Stilwell

Orientador Interno: Professor Doutor Nuno
Carolino

Orientador Interno

Professor Doutor Nuno Carolino

Coorientador Interno

Mestre Luís Nuno Barros

Orientador Externo

Mestre Nuno Vicente Prates
Hospital Veterinário Muralha de Évora

Dedico aos meus pais, irmão e família!

“Happiness is only real when shared”

- *Into the wild*

AGRADECIMENTOS

Ao chegar ao fim desta etapa, não podia deixar de agradecer a todos aqueles que contribuíram e ajudaram na sua realização.

Aos meus pais, agradeço todos os valores que me inculcaram, todos os esforços feitos ao longo dos anos e por serem um apoio incansável, sem eles não seria a pessoa que sou hoje.

Ao meu irmão Francisco, obrigado por seres quem és. Apesar da distância, serás sempre um apoio, um confidente para qualquer situação. Mais que um irmão, um melhor amigo.

À minha avó Carmina, por estar ao meu lado desde sempre e por me mostrar a vida de uma forma mais inocente e descontraída.

Às minhas amigas de longa data, Beatriz Cardoso e Sofia Fragoso, mesmo não estando presentes todos os dias, são sem dúvida uma parte fundamental na minha vida, um porto seguro. Sem vocês isto não seria possível.

A todas as novas amigas que tive oportunidade de fazer nestes últimos 6 anos, sem dúvida que ficam como uma família para mim. Em especial, à Inês Dias por todo o companheirismo, ajuda e por estar sempre presente, tanto nas noites de estudo, trabalhos como também nas aventuras e momentos de diversão. É para a vida!

Ao meu orientador e coorientador, Dr. Nuno Carolino e Dr. Luís Nuno Barros por toda a disponibilidade e apoio que deram ao longo da elaboração deste trabalho.

À EUVG por me acolher nestes últimos anos e por contribuir para a minha formação. Um especial agradecimento à Sandra por toda a ajuda dada ao longo destes anos e principalmente nos últimos meses.

A toda a equipa do Hospital Muralha de Évora, agradeço a disponibilidade que tiveram em receberem-me durante cinco meses. Ao meu orientador externo, Dr. Nuno Vicente Prates por me acompanhar ao longo de todo o estágio e por me transmitir os seus conhecimentos e ao Dr. Rui Martins por ser um exemplo e pela ajuda dada para a realização deste trabalho.

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS.....	iv
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vi
ÍNDICE DE TABELAS.....	vii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	viii
PÁGINA DE TÍTULO	1
RESUMO	2
ABSTRACT	3
1. INTRODUÇÃO	4
2. APRESENTAÇÃO DO CASO	6
2.1 ANAMNESE	6
2.2 APRESENTAÇÃO CLÍNICA DO ANIMAL.....	6
2.3 EXAMES DIAGNÓSTICOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS EFECTUADOS E RESPECTIVOS RESULTADOS	8
3. DISCUSSÃO	10
4. CONCLUSÕES.....	14
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	15

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 <i>BORREGO COM CIRCLING</i>	6
FIGURA 2 <i>BORREGO COM ORELHA ESQUERDA DESCAÍDA.</i>	7
FIGURA 3 <i>ENCÉFALO DE UM DOS BORREGOS</i>	8
FIGURA 4 <i>CICLO INTRACELULAR DA L. MONOCYTOGENES (ADAPTADO DE PORTNOY ET AL., 2002).</i>	11

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1 SINTOMATOLOGIA ASSOCIADA À DISFUNÇÃO DOS NÚCLEOS DOS NERVOS CRANIANOS. (ADAPTADO DE WALLAND ET AL., 2015).	5
TABELA 2 RESULTADOS DA ANÁLISE LABORATORIAL PARA <i>L. MONOCYTOGENES</i>	9

LISTA DE ABREVIATURAS

ActA: Proteína polimerizadora de actina

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

BID: Duas vezes ao dia (do Latim *bis in die*)

BHE: Barreira Hematoencefálica

bpm: Batimentos por minuto

CFU: Unidade de formação de Colônia

Ct: Limiar do Ciclo (do inglês Cycle Threshold)

Inl A: Internalinas A

IU: Unidades Internacionais (do inglês International Units)

Kg: Quilograma

LCR: Líquido Cefalorraquidiano

LLO: Listeriolisina O

µm: micrometro

ml: mililitro

mg: miligrama

OMS: Organização Mundial de Saúde

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês Polymerase Chain Reaction)

pH: Potencial de Hidrogénio

PLCs: Fosfolipases C

QID: Quatro vezes ao dia (do latim *quater in die*)

rpm: Respirações por minuto

SID: Uma vez ao dia (do Latim *semel in die*)

SNC: Sistema Nervoso Central

TID: Três vezes ao dia (do Latim *ter in die*)

®: Marca registada

%: Percentagem

PÁGINA DE TÍTULO

Listeriose em Pequenos Ruminantes: Apresentação de um Caso Clínico

Ana Santos ^a, Luís Nuno Barros ^a, Nuno Carolino ^a

^a Departamento de Medicina Veterinária, Escola Universitária Vasco da Gama, Av. José R. Sousa Fernandes 197, Campus Universitário - Bloco B, Lordemão, 3020-210, Coimbra, Portugal
(anaqueiros94@hotmail.com) (lnfbarros@gmail.com) (carolinonuno@hotmail.com)

RESUMO

A Listeriose é uma doença infecciosa de carácter zoonótico causada pela bactéria *Listeria monocytogenes*. Esta afeta tanto o ser humano como os animais domésticos, nomeadamente os ruminantes, sendo os pequenos ruminantes mais afetados.

L. monocytogenes é uma bactéria intracelular, gram-positiva, com distribuição ubiquitária e com características de organismo anaeróbio facultativo, tolerando e proliferando em condições hostis de temperatura e pH.

Em ruminantes, casos de listeriose estão diretamente relacionadas com a ingestão de silagem contaminada. Isto deve-se ao facto de a silagem estar indevidamente condicionada, proporcionando um meio favorável ao crescimento da bactéria.

A Listeriose manifesta-se principalmente através de três formas da doença: a forma encefálica, septicémica e a abortiva. A forma encefálica ou “Circling Disease” é considerada uma das mais prevalentes e será abordada nesta dissertação.

O ciclo intracelular da bactéria é conhecido, contudo a forma como a *L. monocytogenes* afeta o sistema nervoso central (SNC), ainda merece maior compreensão.

Os borregos referentes ao presente caso clínico, apresentavam sinais clínicos compatíveis com a forma encefálica. Os sinais mais comuns nesta infeção do SNC são: hipertermia, prostração e inapetência, anorexia, incoordenação, torção e cabeça inclinada.

O tratamento é pouco eficaz e após o aparecimento dos primeiros sinais neurológicos, normalmente ocorre morte dos animais. A terapêutica mais indicada passa pelo uso de antimicrobianos e para complementar, hidratação endovenosa e corticoterapia.

O diagnóstico é baseado na história, sinais clínicos e na deteção da bactéria. Um diagnóstico definitivo apenas pode ser realizado *post mortem* e, na forma encefálica, a amostra mais indicada a ser recolhida é o encéfalo.

Palavras-chave: Forma Encefálica; *Listeria monocytogenes*; Listeriose; Ovinos.

ABSTRACT

Listeriosis is an infectious and zoonotic diseases caused by *Listeria monocytogenes*. It can affect humans as well as domestic animals, including ruminants in which small ruminants are more commonly affected.

L. monocytogenes are intracellular, gram-positive bacteria, with a ubiquitous distribution and facultative anaerobic characteristics, allowing the bacteria to tolerate and proliferate under hostile conditions of temperature and pH.

In ruminants, listeriosis is often linked to consumption of contaminated silage, this is due to poor fermentation that provides a unique environment for the bacteria.

Listeriosis manifestations include three main forms: encephalitic, septicaemic and abortive. Encephalitic form or Circling Disease is one of the most frequently form of listeriosis and will be described in this dissertation.

The intracellular life cycle of the *L. monocytogenes* has been known for long, yet it is still necessary to understand how it affects the central nerve system (CNS).

The lambs in this clinical case revealed clinical sings compatible with the encephalitic form. Signs common to CNS infection include hyperthermia, prostration, lack of appetite, anorexia, incoordination, circling and head tilt.

Treatment is seldom successful and after the first neurologic signs, animals frequently die despite treatment. The therapeutic options include the use of antimicrobials with a supportive therapy like hydration intravenous and corticotherapy.

Diagnosis is based on history, clinical signs and the detection of the bacteria. A definitive diagnosis of the encephalitic form can only be achieved *post mortem* by histopathology examination of brain tissues.

Key words: Encephalitic form; *Listeria monocytogenes*; Listeriosis; Ovine.

1. INTRODUÇÃO

O presente caso clínico refere-se a dois animais, de uma exploração localizada no distrito de Évora, que apresentavam sinais neurológicos compatíveis com Listeriose.

A listeriose é uma doença infecciosa e de carácter zoonótico causada pelo género *Listeria* que afeta tanto o ser humano como animais domésticos, nomeadamente os ruminantes, sendo normalmente observada em ovinos (Dhama *et al.*, 2015). Esta, tem maior incidência em climas temperados, principalmente no inverno, manifestando-se por surtos ou casos isolados e está maioritariamente associada ao consumo de silagem contaminada (Scott, 2015a).

Atualmente, o género *Listeria* apresenta 17 espécies, em que *Listeria monocytogenes* e a *Listeria ivanovii* são consideradas as mais patogénicas (Radoshevich & Cossart, 2017). Nos animais, 85 % dos casos de listeriose são provocados por *L. monocytogenes* (Shoukat *et al.*, 2017). Esta foi descrita pela primeira vez por Murray e seus colaboradores em 1926, tendo sido inicialmente denominada por *Bacterium monocytogenes* (Pal & Ayele, 2017). No final dos anos 80, a *L. monocytogenes* foi oficialmente reconhecida pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como um agente de infeção alimentar para o ser humano (Pal & Ayele, 2017).

L. monocytogenes é uma bactéria patogénica, intracelular e gram-positiva de dimensões reduzidas (cocobacilo com 2 µm x 0,5 µm) (Brugère-Picoux, 2008; Quinn *et al.*, 2011). Esta tem características de organismo anaeróbio facultativo, tolerando e proliferando em condições hostis (temperaturas entre 4 e 45°C, sendo o ambiente ótimo, entre 30°C e 37°C e pH variável, entre 4,5 e 9,6) (Dhama *et al.*, 2015). Também é caracterizada por uma diversidade genética, apresentando várias estirpes divididas em quatro linhagens, sendo as 1/2a, 1/2b e 4b as que mais provocam infeções ao ser humano e animais (Walland *et al.*, 2015).

De distribuição ubiquitária e com características saprófita, a *L. monocytogenes* sobrevive por longos períodos no ambiente, sendo encontrada no solo, água e vegetação (Sharifzadeh *et al.*, 2015). Também se pode encontrar no trato gastrointestinal de ruminantes (portadores assintomáticos) contribuindo para a sua disseminação no ambiente (Steckler *et al.*, 2017).

A patogenicidade da *L. monocytogenes* depende da sua capacidade de invadir e de se replicar, tanto em células fagocitárias, como em células não fagocitárias (Oevermann *et al.*, 2010; Henke *et al.*, 2015). Embora se saiba que a infeção se encontra regulada por fatores de virulência que intervêm na entrada, replicação e propagação célula a célula, o desenrolar do processo infeccioso, ainda se encontra por compreender. (Oevermann *et al.*, 2010; Henke *et al.*, 2015).

A Listeriose manifesta-se principalmente através de três formas: a forma encefálica, a septicémica e a abortiva (Dhama *et al.*, 2015). Atualmente, um dos desafios é perceber como a *L. monocytogenes* invade e se dispersa no SNC (Henke *et al.*, 2015).

A forma encefálica de listeriose ou “Circling Disease” é uma das formas mais prevalente em ruminantes (Matto *et al.*, 2017). Pensa-se que a infeção ocorra pelos ramos dos nervos cranianos, principalmente do nervo trigémeo (V), quando associado a lesões na boca dos animais ou por via hematogénica (Oevermann *et al.*, 2010; George, 2014). A listeriose apesar de ser uma doença

associada a animais adultos, esta também pode ocorrer em borregos com acesso a silagem contaminada (Dill & Rissi, 2014; Scott, 2015a).

Os sinais clínicos variam consoante o animal, podendo este apresentar hipertermia, prostração, inapetência, anorexia e a presença de sinais neurológicos que diferem consoante a localização das lesões provocadas pela *L. monocytogenes* no SNC (Fentahun, 2012).

Os sinais neurológicos, normalmente unilaterais, afetam os nervos cranianos e o tronco cerebral (Quadro 2) (Walland *et al.*, 2015). Segundo Dreyer *et al.* (2015) e Henke *et al.* (2015) a romboencefalite é a manifestação mais comum da forma encefálica em ruminantes.

Tabela 1 Sintomatologia associada à disfunção dos núcleos dos Nervos Cranianos. (Adaptado de Walland *et al.*, 2015).

Nervos Cranianos mais afetados	
Nervo Trigêmeo (V)	Dificuldade na mastigação e mandíbula caída. Redução da sensibilidade da região da face. Redução dos reflexos da pálpebra e ameaça.
Nervo Facial (VII)	Orelha, pálpebra superior e lábio descaídos. Redução dos reflexos da pálpebra e ameaça.
Nervo Vestíbulo-coclear (VIII)	Nistagmos, Circling e Head-tilt.
Nervo Glossofaríngeo (IX) e Nervo Vago (X)	Dificuldade na deglutição.
Nervo Hipoglosso (XII)	Paresia ou Paralisia da língua.

Em pequenos ruminantes, após os primeiros sinais clínicos, a progressão da doença é relativamente rápida, ocorrendo a morte após 24 a 48 horas (Scott, 2010).

O tratamento passa pelo uso de antimicrobianos em elevadas doses (ex.: Penicilinas) e, de forma complementar, hidratação endovenosa e corticoterapia (Scott, 2015a). Numa fase inicial, o tratamento pode ser eficaz, contudo, na presença dos primeiros sinais neurológicos, acaba por haver uma menor resposta ao tratamento e, consequentemente, morte do animal (Dhama *et al.*, 2015).

O diagnóstico é baseado na história, sinais clínicos e deteção da bactéria (Pal & Ayele, 2017). O diagnóstico definitivo, apenas é possível *post mortem* com o isolamento e identificação de *L. monocytogenes* e, no caso de a suspeita ser a forma encefálica, como o caso clínico abordado nesta dissertação, deve proceder-se à recolha de encéfalo no momento da necropsia (Dhama *et al.*, 2015).

2. APRESENTAÇÃO DO CASO

2.1 ANAMNESE

No decorrer do Estágio Curricular foi possível presenciar dois casos de listeriose numa exploração no distrito de Évora. Estes ocorreram a cinco de dezembro de 2017.

Os casos de listeriose surgiram em dois animais da espécie ovina, uma fêmea e um macho da raça merina, num rebanho explorado em regime semiextensivo, com um efetivo de 180 ovelhas adultas.

No que se refere à história clínica da exploração, o produtor, não referiu qualquer alteração pertinente no manejo dos animais ou outras patologias concomitantes. Sabe-se que anteriormente ocorreram outros casos de animais com sintomatologia idêntica, contudo, na altura, não foram submetidos a tratamento direcionado para listeriose e não foi feito um diagnóstico preciso após a morte dos animais.

O efetivo encontrava-se todo num único ovil e a nível do manejo alimentar, tinha acesso a pastoreio e feno-silagem, sendo que esta se encontrava armazenada em fardos envolvidos por uma película de plástico.

No que diz respeito às medidas profiláticas instituídas, todos os animais estavam desparasitados contra parasitas gastrointestinais, pulmonares e formas larvares de *Oestrus ovis* e encontravam-se vacinados contra clostrídios, tendo estas ocorrido aproximadamente um mês antes do registo destes dois casos.

2.2 APRESENTAÇÃO CLÍNICA DO ANIMAL

Os dois animais, uma fêmea e um macho, apresentavam idades entre um mês e meio e os dois meses.

No exame físico, o macho pesava aproximadamente 15 Kg, tinha uma temperatura corporal de 42°C e relativamente à frequência cardíaca e respiratória, por dificuldades à auscultação, não foi possível medir.

O macho apresentava torção, sendo que andava em círculos para o mesmo lado (lado direito). Segundo o produtor, o animal encontrava-se naquela condição desde do dia anterior (Figura 1).



Figura 1 Borrego com torção.

Para além do torneio, o animal também apresentava orelha descaída (lado direito), redução dos reflexos de ameaça (lado direito), sialorreia e grande acumulação de alimento na boca.

A fêmea, no exame físico, apresentou um peso idêntico ao do macho (aproximadamente 15 Kg), temperatura corporal de 40°C, frequência cardíaca de 60 bpm e a frequência respiratória de 35 rpm.

Os sinais clínicos, na sua maioria, eram similares aos do macho. Esta também apresentava orelha descaída (lado esquerdo), redução dos reflexos de ameaça (lado esquerdo) e sialorreia (Figura 2). Porém, observou-se que a fêmea estava mais prostrada, não se levantando por iniciativa própria e, quando se encontrava em estação, procurava uma superfície onde suportar a cabeça.

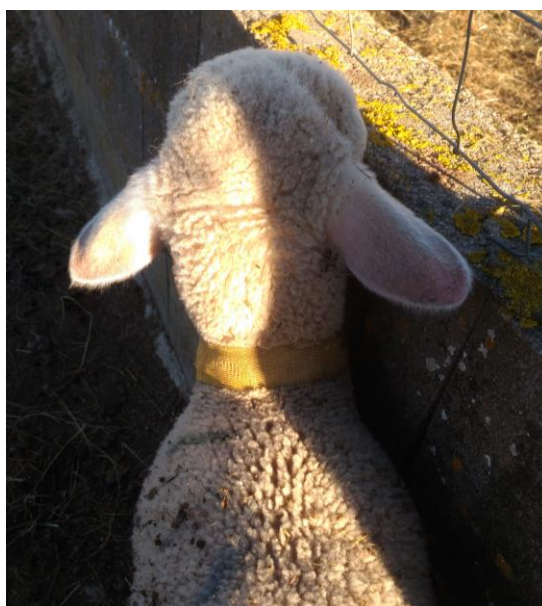


Figura 2 Borrego com orelha esquerda descaída.

Considerando os sinais clínicos descritos e tendo em conta que nenhum é patognomónico de listeriose, deve-se ter em conta outros possíveis diagnósticos (Scott, 2015b):

- Cenurose (Falso Torneio), provocada por *Coenurus cerebralis*, forma larvar de *Taenia multiceps*, que após a ingestão por parte dos ovinos realiza migrações até ao SNC, promovendo sinais clínicos neurológicos idênticos, como por exemplo o torneio;
- Lesões vestibulares periféricas associadas a otite média ou interna, sendo que nesta situação apenas ocorre disfunção dos nervos cranianos facial (VII) e vestibulo-coclear (VIII);
- Polioencefalomalácia, patologia nervosa não infecciosa que afeta ruminantes, sendo provocada pela deficiência em tiamina. Os animais podem apresentar prostração, incoordenação motora e nistagmos.
- Traumas e abscessos cerebrais.

2.3 EXAMES DIAGNÓSTICOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS EFECTUADOS E RESPECTIVOS RESULTADOS

Após a morte dos animais e ainda no mesmo dia, foi realizado a necropsia de ambos os borregos. Na necropsia, observou-se os encéfalos e estes, apesar de estarem mais friáveis que o normal, não apresentavam lesões macroscópicas evidentes, enquanto que ao nível do fígado foram observadas pequenas alterações. Ambos animais não apresentavam outras alterações relevantes.

Devido à suspeita da forma encefálica de listeriose, o Médico Veterinário decidiu recolher os encéfalos (Figura 3).



Figura 3 *Encéfalo de um dos borregos.*

As amostras recolhidas (encéfalos) foram enviadas para laboratório (EXOPOL – Laboratório Veterinário Espanhol) de forma a ser feito o despiste para *L. monocytogenes* pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (PCR-Tempo Real), uma análise mais rápida e simples que permite amplificar e quantificar o ADN de uma amostra.

Os resultados obtidos, como demonstra a tabela dois, permitiram confirmar as suspeitas do Médico Veterinário da forma encefálica de listeriose.

Tabela 2 Resultados da análise laboratorial para *L. monocytogenes*.

Análise Laboratorial			
Suspeita	Amostra	Resultado	Valor Ct*
<i>L. monocytogenes</i>	Encéfalo	Positivo	27,35
<i>L. monocytogenes</i>	Encéfalo	Positivo	21,03

*Uma amostra considera-se positiva com um valor de $Ct \leq 38$.

Valor de Ct - Corresponde ao número de ciclos necessários para que a fluorescência da reação seja detetável.

Para além da recolha dos encéfalos, na consulta do dia cinco de dezembro de 2017, procedeu-se à recolha de uma amostra da feno-silagem, sendo recolhidas pequenas porções da periferia e centro de um dos fardos da exploração. O fardo apresentava a película de plástico com alguns rasgões e a feno-silagem da periferia do fardo, tinha áreas danificadas, exibindo um aspeto de putrefação. A amostra foi analisada em laboratório e o resultado foi negativo para *L. monocytogenes*.

2.4 TRATAMENTO

A terapêutica implementar pelo Médico Veterinário aos dois borregos teve por base o uso de antimicrobianos em doses elevadas, tendo sido administrado, Penicilina G Procaína (600,000 IU) associado a Di-hidroestreptomicina (600 mg) (Sorobiótico®), via intramuscular, deixando ficar doses iguais para administrações nos três dias seguintes. (Quinn *et al.*, 2011).

George (2014) refere uma terapêutica com penicilina, em que a dose inicial é de 40,000 IU/Kg (Penicilina G potássio) via intravenosa, três vezes por dia (TID) ou quatro vezes por dia (QID) durante sete dias e depois 22,000 IU/Kg (Penicilina G Procaína), via intramuscular, uma vez por dia (SID) durante 14 a 21 dias. Scott (2012) também refere terapia com penicilina, mas com dose inicial de 200,000 IU/Kg via intravenosa e depois de 44,000 IU/Kg via intravenosa, duas vezes por dia (BID), durante cinco dias.

As penicilinas são o antimicrobiano de eleição para o tratamento de listeriose e, além destas, a *L. monocytogenes* apresenta ser suscetível a outros antimicrobiano (Scott, 2015a). Neste sentido, podemos referir as Tetraciclina (Dhama *et al.*, 2015), a Eritromicina (Saminathan *et al.*, 2016) e Sulfonamidas/Trimetoprim (Scott, 2010).

George (2014), também refere tratamento com oxitetraciclina com doses superiores a 10 mg/Kg, SID, durante cinco dias. Contudo, Boileau e Gilliam (2016) referem que o tratamento com penicilina e oxitetraciclina já apresentaram resultados tanto positivos como negativos.

Para complementar o tratamento, foram administrados 5 ml de vitamina B1 (Bê Fortil ®) via intramuscular e 0,5 ml de dexametasona (Dexafort ®) via intramuscular (Brugère-Picoux, 2008; Fentahun, 2012).

3. DISCUSSÃO

Na prática clínica, casos de listeriose são pouco comuns, estando associados a uma recuperação pouco favorável do animal (Walland *et al.*, 2015), como sucedeu nos dois borregos. Dois dias após a consulta, no dia sete de dezembro de 2017, os animais encontravam-se mortos. Segundo Scott (2015a), o número de ovinos afetados clinicamente num surto normalmente é inferior a 2 % e só em casos esporádicos atinge os 10 % do efetivo.

Como já referido, na necropsia, apenas foram recolhidos os encéfalos dos borregos e segundo a informação facultada pelo Médico Veterinário, os dois encéfalos não apresentavam grandes alterações macroscópicas, estando apenas um pouco friáveis, principalmente na região do tronco cerebral, podendo ser devido à infeção provocada pela bactéria (Oevermann *et al.*, 2010; Dill & Rissi, 2014).

Apesar de não se terem recolhido amostras de fígado, as pequenas alterações observadas, segundo o Médico Veterinário, aparentavam ser compatíveis com pequenos focos necróticos, lesões que a *L. monocytogenes* pode promover.

Devido aos sinais neurológicos apresentados pelos animais, a forma encefálica de listeriose é plausível. É de referir que, borregos muito jovens (com menos de 5 semanas) podem apresentar a forma septicémica da listeriose, mas nesses casos, não apresentam sinais neurológicos (Radostits *et al.*, 2007; Fentahun, 2012; Saminathan *et al.*, 2016). O que não sucedeu nesta situação.

Nos borregos deste caso clínico, não foi possível determinar a origem da infeção. A patogenia da forma encefálica de listeriose ainda não está completamente esclarecida, existindo ainda dúvidas relativamente à forma de infeção do SNC, que pode ocorrer por ascensão dos ramos dos nervos cranianos ou por via hematogénica (George, 2014; Boileau & Gilliam, 2016).

Como já referido, a infeção do SNC pode ocorrer por ascensão dos nervos cranianos, principalmente pelos ramos do nervo trigémeo (V), que atinge o tronco cerebral e consequentemente as restantes regiões do encéfalo (Dill & Rissi, 2014; Walland *et al.*, 2015). Lesões nas mucosas orais provocadas por traumas ou nascimento/alteração da dentição do animal em períodos em que são alimentados com silagem contaminada podem ser uma porta de entrada à bactéria para a infeção de SNC (Radostits *et al.*, 2007; Boileau & Gilliam, 2016;). Henke *et al.* (2015) refere que *L. monocytogenes* foi isolada de axónios e núcleos de nervos cranianos, para além que em alguns animais é possível isolar *L. monocytogenes* do encéfalo, sem que seja isolada de outros órgãos.

Quando ingerida, no intestino, a *L. monocytogenes* ultrapassa a barreira intestinal e através da corrente sanguínea e linfática, dissemina-se pelo fígado e baço e numa fase posterior, pode atingir o

SNC transpondo a barreira hematoencefálica (BHE), por um mecanismo ainda pouco definido (Oevermann *et al.*, 2010).

A disseminação eficiente que *L. monocytogenes* apresenta pode dever-se ao seu ciclo intracelular, que permite infectar células fagocitárias (ex.: macrófagos) e não fagocitárias (ex.: células epiteliais), sendo a infecção regulada por fatores de virulência que intervêm na entrada, replicação e na propagação célula a célula (Quinn *et al.*, 2011; Dhama *et al.*, 2015; Radoshevich & Cossart, 2017).

Os fatores de virulência incluem as Internalinas (ex.: Inl A), proteínas específicas da superfície celular bacteriana que interagem com recetores presentes na superfície das células do hospedeiro, permitindo a sua entrada (Quinn *et al.*, 2011; Dhama *et al.*, 2015; Radoshevich & Cossart, 2017). Dentro das células do hospedeiro, a Listeriolisina O (LLO), hemolisina produzida pela *L. monocytogenes*, com o auxílio de duas fosfolipases C (PLCs), promovem a rutura da membrana do vacúolo fagocitário que a envolve, sendo esta libertada no citoplasma onde se replica e, por último, a proteína polimerizadora de actina (ActA), presente na superfície da bactéria que promove a polimerização de filamentos de actina do citoesqueleto da célula hospedeira, permitindo a mobilidade não só no citoplasma, como também a propagação para as células vizinhas, sem ocorrer contato extracelular (Figura 4) (Quinn *et al.*, 2011; Dhama *et al.*, 2015; Radoshevich & Cossart, 2017). Assim, o ciclo intracelular da *L. monocytogenes* permite-lhe escapar aos mecanismos de defesa do sistema imunitário e propagar-se, célula a célula, de forma eficiente pelo organismo, incluindo o SNC (Henke *et al.*, 2015).

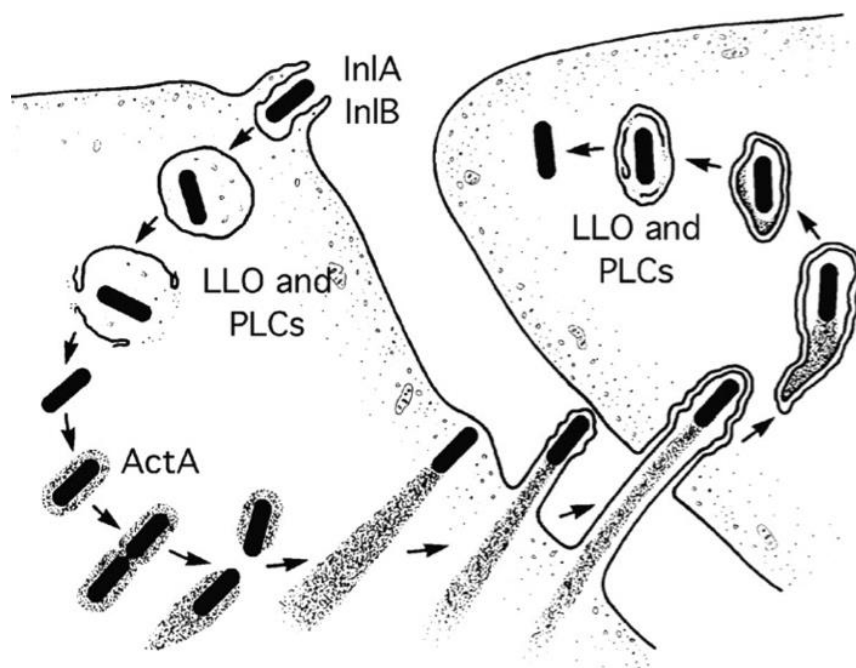


Figura 4 Ciclo intracelular da *L. monocytogenes* (Adaptado de Portnoy *et al.*, 2002).

A forma encefálica de listeriose não apresenta predisposição de género ou de idade (Scott, 2010; Dill & Rissi, 2014). Apenas um número reduzido de animais desenvolve doença clínica, quando perante

determinados fatores de risco (Radostits *et al.*, 2007). Fatores esses relacionados com o animal e meio ambiente da exploração, como por exemplo, animais imunodeprimidos, situações de stress, dose de ingestão da bactéria, alteração da alimentação, sobredensidade populacional do local ou alterações meteorológicas (Walland *et al.*, 2015).

No presente caso, a imunodepressão, dose de infecção e sobredensidade populacional podem estar relacionadas com o desenvolvimento da doença clínica.

Clinicamente, a forma encefálica de listeriose, apresenta-se como uma encefalite, sendo a romboencefalite (envolvimento do tronco cerebral) a mais frequente em ruminantes ao contrário do ser humano, que se apresenta mais sob a forma de meningoencefalite e meningite (Oevermann *et al.*, 2010; Leclercq, 2014;).

Os sinais neurológicos de ambos os borregos, indicavam lesões a nível dos nervos cranianos, sendo os mais afetados, o trigêmeo (V), facial (VII) e o vestibulo-coclear (VIII) conforme descrito por Radostits *et al.* (2007) e Dill e Rissi (2014).

Os sinais neurológicos apresentam-se ipsilaterais à disfunção do nervo craniano (Radostits *et al.*, 2007). Assim, as lesões que o macho apresentava indicava a disfunção dos nervos cranianos do lado direito e na fêmea a disfunção dos nervos cranianos eram do lado esquerdo.

A ampla distribuição da *L. monocytogenes* e o facto dos ruminantes serem agentes relevantes na disseminação da bactéria no meio ambiente, torna-se necessário manter um bom maneio na saúde geral dos rebanhos (Dreyer *et al.*, 2015). Para o controlo e prevenção, deve-se ter em conta a higiene da exploração com a limpeza regular das instalações, comedouros e bebedouros, bem como manter a qualidade na preparação e armazenamento da silagem de forma a que esta não fique contaminada, caso contrário, deve ser logo retirada da alimentação (Fentahun, 2012). Em determinadas circunstâncias, a *L. monocytogenes* pode atingir 10^7 CFU/Kg de silagem (Quinn *et al.*, 2011). Segundo Walland *et al.* (2015) é imprescindível realizarem-se mais estudos para compreender qual a dose necessária para infetar o animal.

A preparação da silagem requer uma fermentação correta do material vegetal com altos teores de humidade (superior a 50 %), sendo essencial proceder-se à eliminação do ar, de forma a tornar um meio anaeróbio e ter um pH inferior a 5,5, caso contrário, poderá promover o crescimento da *L. monocytogenes*. (Sharifzadeh *et al.*, 2015).

Sharifzadeh *et al.* (2015) referem que vários estudos verificaram que a silagem indevidamente acondicionada, mal fermentada e com pH superior a 5,5, proporciona um meio favorável ao crescimento de *L. monocytogenes*. No armazenamento da silagem é essencial garantir uma barreira física que evite contaminação do exterior (Shoukat *et al.*, 2017). A silagem que se encontra nas zonas mais periféricas, não deve ser dada aos animais, pois tem maior probabilidade de sofrer alterações, uma vez que o plástico presente a envolver a silagem pode sofrer danos e permitir o seu contato com o meio ambiente (Radostits *et al.*, 2007; Shoukat *et al.*, 2017).

Casos de listeriose ocorrer nos 10 dias após a alimentação com silagem contaminada (Scott, 2010). Apesar de se relacionar com o consumo de silagem, esta não é a única fonte de infecção possível. Dreyer *et al.* (2015) demonstrou que a *L. monocytogenes* pode ser detetada em amostras de solo e

água e, segundo Matto *et al.* (2017), casos de listeriose também podem ocorrer em animais de pastoreio, reportando um caso de um bovino.

Neste caso clínico, apenas se realizou análise à silagem e o resultado foi negativo, o que poderá indicar que a fonte de infecção é outra. Contudo, a silagem não deve ser completamente descartada, uma vez que o fardo que o produtor usou para alimentar os animais antes das ocorrências, já tinha sido distribuído pelo efetivo, como também a amostra recolhida poderia ser de zonas do fardo que não continham a *L. monocytogenes*. Também pode ter sido uma amostra pouco representativa, uma vez que apenas se analisou um fardo.

A abordagem de diagnóstico no presente caso, com a recolha dos encéfalos e posterior isolamento da bactéria por PCR-Tempo Real, foi uma opção adequada. Segundo Quinn *et al.*, (2011), a técnica de PCR-Tempo Real, indica ser uma técnica sensível e rápida na quantificação da quantidade de DNA de uma amostra. Além do PCR-Tempo Real, outras técnicas de identificação e isolamento da bactéria podiam ser realizadas, como técnicas de imunohistoquímica, imunofluorescência e/ou de cultura bacteriana (Dill & Rissi, 2014; Leclercq, 2014). Métodos histopatológicos também são uma ajuda no diagnóstico definitivo de listeriose na forma encefálica, uma vez que através destes é possível observar microabscessos e infiltrados linfocíticos perivasculares no tronco cerebral, que são lesões patognomónicas de listeriose (Boileau & Gilliam, 2016; Fentahun, 2012; Radostits *et al.*, 2007). Como diagnóstico presuntivo (*ante mortem*), além da interpretação dos sinais neurológicos, podia-se ter recolhido e analisado o líquido cefalorraquidiano (LCR), uma vez que em casos de listeriose, perante a infecção, ocorre um aumento da concentração de proteínas (> 0.4 g/L) e de leucócitos (pleocitose) (Scott, 2015a). No entanto, o Médico Veterinário não optou pela realização da análise do LCR, uma vez que não é possível a deteção da *L. monocytogenes* como também, esta análise, não se correlaciona com o prognóstico da doença (George, 2014).

Tendo em conta os sinais clínicos, os animais encontravam-se numa fase adiantada da doença o que levou a uma fraca resposta do tratamento, concordando com Scott, (2015a) e Walland *et al.*, (2015).

O tratamento como já referido, na maior parte das vezes, não apresenta resultados favoráveis devendo-se à habilidade que a *L. monocytogenes* tem de se multiplicar em meio intracelular e por muitos dos antimicrobianos não apresentarem capacidades de penetrar a parede celular e de passarem a BHE (Ferguson *et al.*, 2012; Boileau & Gilliam, 2016).

A terapêutica implementada com antimicrobianos pode ser dispendiosa, uma vez que devem ser usadas doses elevadas por um longo período, podendo chegar a um mês, de forma a atingir concentrações bactericidas mínimas a nível do SNC (Scott, 2010; George, 2014). Também é importante que o uso destes seja criterioso, de forma a controlar possíveis resistências (Saminathan *et al.*, 2016).

Na sua generalidade, os autores, optam pelo uso das penicilinas para o tratamento, contudo a dosagem demonstra ser um pouco variável, e no caso em questão, foi acima dos valores descritos numa tentativa de obter resultado positivo na recuperação dos animais.

4. CONCLUSÕES

Com a elaboração desta dissertação, fiquei com uma melhor percepção do que é a listeriose e como esta pode ter repercussões negativas para as explorações e a sua importância na saúde pública, pelo seu carácter zoonótico.

Perante este caso, pouco havia a fazer devido ao avançado estado da doença apresentada pelos animais. Apesar de um mau prognóstico, considero que se podia ter recolhido amostras hepáticas para análise, a fim de se aferir qual a relação das lesões observadas nos fígados dos animais com o presente caso de listeriose, visto que a literatura atual refere como principal via de infeção da forma encefálica, a ascensão pelos ramos dos nervos cranianos, associado a lesões nas mucosas orais dos animais.

No sentido de prevenir novas situações, o produtor deverá realizar novas análises à silagem, mas também contemplar análises ao solo e à água.

Devido a um diagnóstico presuntivo, o médico veterinário deverá ser capaz de descartar os vários diagnósticos diferenciais, de forma a permitir que o tratamento a implementar seja direccionado à listeriose o mais rápido possível, a fim de uma recuperação favorável. O tratamento por se revelar pouco eficaz e dispendioso, na maioria das situações, os produtores optam por não o realizar, procedendo ao abate dos animais.

Outra consideração, que devemos ter em conta, é o facto de se usar elevadas doses de antimicrobianos, o que pode levar a um aumento da resistência da bactéria.

Por último, tendo em conta o carácter zoonótico da *L. monocytogenes* e as suas características intracelulares, é necessário realizar mais estudos sobre a forma como esta infeta o SNC. No futuro, se estes estudos se revelarem proveitosos, poderão ser uma mais valia para uma melhoria da abordagem do diagnóstico e terapêutica e consequentemente melhoria do seu prognóstico.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Boileau, M. J., & Gilliam, J. (2016). Brainstem and Cranial Nerve Disorders of Ruminants. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 33(1), 67–99.
<https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2016.09.007>
- Brugère-Picoux, J. (2008). Ovine listeriosis. *Small Ruminant Research*, 76(1–2), 12–20.
<https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2007.12.022>
- Dhama, K., Karthik, K., Tiwari, R., Shabbir, M. Z., Barbuddhe, S., Malik, S. V. S., & Singh, R. K. (2015). Listeriosis in animals, its public health significance (food-borne zoonosis) and advances in diagnosis and control: a comprehensive review. *Veterinary Quarterly*, 35(4), 211–235.
<https://doi.org/10.1080/01652176.2015.1063023>
- Dill, J. A., & Rissi, D. R. (2014). Diagnostic Exercise: Suppurative Rhombencephalitis and Meningitis in a Goat. *Veterinary Pathology*, 51(4), 828–831. <https://doi.org/10.1177/0300985813485095>
- Dreyer, M., Thomann, A., Böttcher, S., Frey, J., & Oevermann, A. (2015). Outbreak investigation identifies a single *Listeria monocytogenes* strain in sheep with different clinical manifestations, soil and water. *Veterinary Microbiology*, 179(1–2), 69–75.
<https://doi.org/10.1016/J.VETMIC.2015.01.025>
- Fentahun, T. & Fresebehat, A. (2012). Listeriosis in Small Ruminants : A Review. *Advances in Biological Research*, 6(6), 202–209. <https://doi.org/10.5829/idosi.abr.2012.6.6.66159>
- Ferguson, S. H., Rech R. R., Howerth E. W., Camus, M. S. (2012). Pathology in Practice. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 241(August), 443–445.
<https://doi.org/https://doi.org/10.2460/javma.241.4.443>
- George, L. W. (2014). Listeriosis (Circling Disease; Silage Disease; *Listeria monocytogenes* Infection). In B. P. Smith (Ed.), *Large Animal Internal Medicine* (5th ed., pp. 969–971). Missouri: Elsevier Mosby.
- Henke, D., Rupp, S., Gaschen, V., Stoffel, M. H., Frey, J., Vandeveld, M., & Oevermann, A. (2015). *Listeria monocytogenes* spreads within the brain by actin-based intra-axonal migration. *Infection and Immunity*, 83(6), 2409–2419. <https://doi.org/10.1128/IAI.00316-15>
- Leclercq, A. (2014). *Listeria monocytogenes*. In *OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals* (pp. 1–18). Retrieved from <http://www.oie.int/en/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>
- Matto, C., Varela, G., Mota, M. I., Giannechini, R., & Rivero, R. (2017). Rhombencephalitis caused by *Listeria monocytogenes* in a pastured bull. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*,

29(2), 228–231. <https://doi.org/10.1177/1040638716689116>

- Oevermann, A., Zurbriggen, A., & Vandeveld, M. (2010). Rhombencephalitis caused by listeria monocytogenes in humans and ruminants: A zoonosis on the rise? *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, 2010, 22. <https://doi.org/10.1155/2010/632513>
- Pal, M., Ayele, Y., Kundu, P. and Jadhav, J. (2017). Growing Importance of Listeriosis as Foodborne Disease. *Journal of Experimental Food Chemistry*, 3(4). <https://doi.org/10.4172/2472-0542.1000133>
- Portnoy, D. A., Auerbuch, V., & Glomski, I. J. (2002). The cell biology of *Listeria monocytogenes* infection: the intersection of bacterial pathogenesis and cell-mediated immunity. *The Journal of Cell Biology*, 158(3), 409–414. <https://doi.org/http://doi.org/10.1083/jcb.200205009>
- Quinn, J. P., Markey, K.B., Carter E. M.; Donnelly, J. W., L. and C. F. (2011). *Listeria Species*. In *Veterinary Microbiology and Microbial Disease* (2nd ed., pp. 217–221). Dublin: Wiley-Blackwell.
- Radoshevich, L., & Cossart, P. (2017). *Listeria monocytogenes*: Towards a complete picture of its physiology and pathogenesis. *Nature Reviews Microbiology*, 16(1), 32–46. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.126>
- Radostits, O.M., Gay, C.C., Hinchcliff K.W. and Constable, P. D. (2007). Diseases associated with *Listeria species*. In *Veterinary Medicine* (10th ed., pp. 805–810). London: Elsevier.
- Saminathan, M., Rana, R., Ramakrishnan, M. A., Karthik, K., Malik, Y. S., & Dhama, K. (2016). Prevalence, diagnosis, management and control of important diseases of ruminants with special reference to indian scenario. *Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences*, 4(3S), 338–367. [https://doi.org/10.18006/2016.4\(3S\).338.367](https://doi.org/10.18006/2016.4(3S).338.367)
- Scott, P. R. (2010). Listeriosis. In C. M. Kahn (Ed.), *Merck Veterinary Manual* (10th ed., pp. 598–599). Kendallille: Merck&Co.,INC.
- Scott, P. R. (2012). Clinical diagnosis of ovine listeriosis. *Small Ruminant Research*, 110(2–3), 138–141. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2012.11.002>
- Scott, P. R. (2015a). Listeriosis. In *Sheep Medicine* (2nd ed., pp. 211–216). New York: CRC Press.
- Scott, P. R. (2015b). Neurological diseases. In *Sheep Medicine* (2nd ed., pp. 187–211). New York: CRC Press.
- Sharifzadeh, A., Momeni, H., Ghasemi-Dehkordi, P., & Doosti, A. (2015). Presence of *Listeria monocytogenes* in silage products of Shahrekord city. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 5(S1), S133–S136. [https://doi.org/10.1016/S2222-1808\(15\)60874-X](https://doi.org/10.1016/S2222-1808(15)60874-X)

- Shoukat, S., Ali, M., Wani, H., Ali, U., Para, P. A., & Ganguly, S. (2017). Food-Borne Listeriosis, An Upcoming Public Health Problem: A Review. *Journal of Immunology and Immunopathology*, 19(1), 1–9. <https://doi.org/10.5958/0973-9149.2017.00001.6>
- Steckler, A. J., Cardenas-Alvarez, M. X., Townsend Ramsett, M. K., Dyer, N., & Bergholz, T. M. (2017). Genetic characterization of *Listeria monocytogenes* from ruminant listeriosis from different geographical regions in the U.S. *Veterinary Microbiology*, 215(December), 93–97. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.12.021>
- Walland, J., Lauper, J., Frey, J., Imhof, R., Stephan, R., Seuberlich, T., & Oevermann, A. (2015). *Listeria monocytogenes* infection in ruminants: Is there a link to the environment, food and human health? A review. *Schweizer Archiv Fur Tierheilkunde*, 157(6), 319–328. <https://doi.org/10.17236/sat00022>